

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510090065.0

[45] 授权公告日 2007 年 12 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 100352914C

[22] 申请日 2005.8.11

[21] 申请号 200510090065.0

[73] 专利权人 中国科学院植物研究所

地址 100093 北京市海淀区香山南辛村 20
号中科院植物所

[72] 发明人 田世平 王友升 徐 勇

[56] 参考文献

CN1507878A 2004.6.30

CN154444614A 2004.11.10

RU2148648C1 2000.5.10

CN1543796A 2004.11.10

罗伦隐球酵母对葡萄采后病害的拮抗效果.
刘海波等. 中国农业科学, 第 35 卷第 7 期.
2002

审查员 冯 怡

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 关 畅

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 2 页

[54] 发明名称

酵母拮抗菌罗伦隐球酵母的真空冷冻干燥制品及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了酵母拮抗菌罗伦隐球酵母的一种真空冷冻干燥制品及其制备方法。该真空冷冻干燥制品，是收集经培养 24 - 48h 的罗伦隐球酵母的菌体，将其用保护剂制成浓度为 $5 \times 10^8 - 5 \times 10^9$ 个细胞/ml 的菌悬液，孵育 1 - 2h，再进行真空冷冻干燥后得到的产品；所述保护剂为质量百分含量为 5 - 10% 的葡萄糖、蔗糖、醋酸钠、脱脂奶粉或谷氨酸钠水溶液。用本发明的方法制备的罗伦隐球酵母真空冷冻干燥制品具有较高的生物活性，活菌率可达 80%。本发明制备工艺简单、成本低廉，具有工业化生产的可行性，将在酵母拮抗菌罗伦隐球酵母及其它微生物的保藏及其相关产品的制备中发挥巨大作用。

1、罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*) 的真空冷冻干燥制品, 是收集经培养 24-48h 的罗伦隐球酵母菌体, 将其用保护剂制成浓度为 5×10^8 - 5×10^9 个细胞 / mL 的菌悬液, 孵育 1-2h, 再进行真空冷冻干燥后得到的产品; 所述保护剂为质量百分含量为 5-10% 的葡萄糖、蔗糖、醋酸钠、脱脂奶粉或谷氨酸钠水溶液。

2、根据权利要求 1 所述的罗伦隐球酵母的真空冷冻干燥制品, 其特征在于: 所述罗伦隐球酵母的培养条件为: 按 2% 的接种浓度将罗伦隐球酵母接种于专用培养基中, 在 25°C, 200rpm 下振荡培养; 所述专用培养基的配方为: 柠檬酸 40, 大豆蛋白胨 15, 硫酸镁 1.23, 氯化钙 0.56, 单位: gL^{-1} 。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的罗伦隐球酵母的真空冷冻干燥制品, 其特征在于: 所述保护剂为质量百分含量为 5% 的脱脂奶粉水溶液。

4、根据权利要求 1 或 2 所述的罗伦隐球酵母的真空冷冻干燥制品, 其特征在于: 所述菌悬液的浓度为 5×10^8 个细胞 / mL, 孵育时间为 2h。

5、一种权利要求 1 所述的罗伦隐球酵母的真空冷冻干燥制品的制备方法, 是收集经培养 24-48h 的罗伦隐球酵母菌体, 将其用保护剂制成浓度为 5×10^8 - 5×10^9 个细胞 / mL 的菌悬液, 孵育 1-2h, 再进行真空冷冻干燥后得到罗伦隐球酵母的真空冷冻干燥制品; 所述保护剂为质量百分含量为 5-10% 的葡萄糖、蔗糖、醋酸钠、脱脂奶粉或谷氨酸钠水溶液。

6、根据权利要求 5 所述的制备方法, 其特征在于: 所述罗伦隐球酵母的培养条件为: 按 2% 的接种浓度将罗伦隐球酵母接种于专用培养基中, 在 25°C, 200rpm 下振荡培养; 所述专用培养基的配方为: 柠檬酸 40, 大豆蛋白胨 15, 硫酸镁 1.23, 氯化钙 0.56, 单位: gL^{-1} 。

7、根据权利要求 5 或 6 所述的制备方法, 其特征在于: 所述保护剂为质量百分含量为 5% 的脱脂奶粉水溶液。

8、根据权利要求 5 或 6 所述的制备方法, 其特征在于: 所述菌悬液的浓度为 5×10^8 个细胞 / mL, 孵育时间为 2h。

9、根据权利要求 5 或 6 所述的制备方法, 其特征在于: 所述真空冷冻干燥条件为: 干燥温度 -45°C, 真空度 0.54 mPa, 干燥时间 24 h。

酵母拮抗菌罗伦隐球酵母的真空冷冻干燥制品及其制备方法

技术领域

本发明涉及微生物的真空冷冻干燥制品及其制备方法，特别是涉及酵母拮抗菌罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*, 简称: *C. laurentii*) 的一种真空冷冻干燥制品及其制备方法。

背景技术

目前保持酵母菌生活力的方式主要有：传代培养保藏、液体石蜡低温保藏、斜面低温保藏、半固体穿刺保藏、液氮冷冻保藏和真空冷冻干燥保藏等 (Ashwood-Smith M J. Preservation of microorganisms by freezing, freeze-drying and desiccation. In: Ashwood-Smith M J (Eds). Low Temperature Preservation in Medicine and Biology. Tunbridge Wells: Pitman Medical, 1980, pp219-252.; 李钟庆 编 微生物菌种保藏技术. 北京: 科学出版社, 1989, pp19-28)。由于真空冷冻干燥保藏法具有保藏期长、可避免其它杂菌污染、便于运输和易于实现商品化生产等优点，因而成为目前保存细菌、酵母菌真菌孢子及霉菌最有效、成功的方法之一 (李华, 骆艳娥, 刘延琳. 真空冷冻干燥微生物的研究进展. 微生物学通报, 2002, 29: 78-82)。然而，并非所有的微生物都适合于真空冷冻干燥保存，既能采用真空冷冻干燥保存的微生物，其存活率也可能低于 0.1% (Benny J F, Hennebert G L. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze drying: effects of protectants and cooling rates. *Mycologia*, 1991, 83:805-815.)。据报道，影响微生物真空冷冻干燥效果的因素主要包括：悬浮液浓度、预冻速度、保护剂的种类和浓度以及复水方式等 (Bozoglu T F, Ozilgen M, Bakir U. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme Microbial Technology*, 1987, 9:531-537.; Champagne C P, Gardner N, Brochu E, Beaulier Y. The freeze-drying of lactic acid bacteria: a review. *Can. Inst. Sci. Technol. J.*, 1991, 24: 118-126)。为了获得理想的真空冷冻干燥效果，需要筛选有效地制备方式及其保护剂。但目前国内外尚未见有对酵母拮抗菌罗伦隐球酵母真空冷冻干燥方式效果的报道。

研究表明：酵母拮抗菌罗伦隐球酵母对葡萄、桃、苹果、冬枣、甜樱桃等果实的主要采后病害均具有明显抑制效果 (刘海波, 田世平, 秦国政, 徐勇. 罗伦隐球酵母对葡萄采后病害的拮抗效果. 中国农业科学, 2002, 35:831-835.; 林丽, 田世平,

秦国政, 徐 勇. 两种拮抗酵母菌对桃果实贮藏期间主要病害的防治效果. 中国农业科学, 2003, 36:1535-1539.) ; 可以耐受低温、低氧和高二氧化碳等果实采后的主要贮藏条件 (Qin G Z, Tian S P. Biocontrol of postharvest diseases of jujube fruit by *Cryptococcus laurentii* combined with a low dosage of fungicides under different storage conditions. *Plant Dis.*, 2004a, 88: 497-501.) , 能够与钼酸铵、碳酸氢钠、水杨酸以及低剂量的杀菌剂 (Qin *et al.*, 2004a) 配合使用 (Wan Y K, Tian S P, Qin G Z. Enhancement of biocontrol activity of yeasts by adding sodium bicarbonate or ammonium molybdate to control postharvest disease of jujube fruits. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2003, 37:1-5.) , 并能在采前田间喷施 (Tian S P, Qin G Z, Xu Y. Survival of antagonistic yeasts under field conditions and their biocontrol ability against postharvest diseases of sweet cherry. *Postharvest Biol. Technol.*, 2004a, In press.) , 具有良好的应用前景。

发明内容

本发明的目的是提供一种酵母拮抗菌罗伦隐球酵母的真空冷冻干燥制品。

本发明所提供的酵母拮抗菌罗伦隐球酵母的真空冷冻干燥制品, 是收集经培养 24-48h 的罗伦隐球酵母的菌体, 将其用保护剂制成浓度为 5×10^8 - 5×10^9 个细胞 / mL 的菌悬液, 孵育 1-2h, 再进行真空冷冻干燥后得到的产品; 所述保护剂为质量百分含量为 5-10% 的葡萄糖、蔗糖、醋酸钠、脱脂奶粉或谷氨酸钠水溶液。

所述罗伦隐球酵母的培养条件为: 按 2% 的接种浓度将酵母拮抗菌罗伦隐球酵母接种于专用培养基中, 在 25℃, 200rpm 下振荡培养; 所述专用培养基的配方为: 柠檬酸 40, 大豆蛋白胨 15, 硫酸镁 1.23, 氯化钙 0.56, 单位: $g L^{-1}$ 。

菌悬液的浓度优选为 5×10^8 个细胞 / mL, 孵育时间优选为 2h, 保护剂优选为质量百分含量为 5% 的脱脂奶粉水溶液。

本发明的第二个目的是提供一种上述酵母拮抗菌罗伦隐球酵母的真空冷冻干燥制品的制备方法。

本发明所提供的罗伦隐球酵母的真空冷冻干燥制品的制备方法, 是收集经培养 24-48h 的罗伦隐球酵母的菌体, 将其用保护剂制成浓度为 5×10^8 - 5×10^9 个细胞 / mL 的菌悬液, 孵育 1-2h, 再进行真空冷冻干燥后得到罗伦隐球酵母的真空冷冻干燥制品; 所述保护剂为质量百分含量为 5-10% 的葡萄糖、蔗糖、醋酸钠、脱脂奶粉或谷氨酸钠水溶液。

在上述制备方法中, 所述罗伦隐球酵母的培养条件为: 按 2% 的接种浓度将罗伦隐球酵母接种于专用培养基中, 在 25℃, 200rpm 下振荡培养; 所述专用培养基的配

方为：柠檬酸 40，大豆蛋白胨 15，硫酸镁 1.23，氯化钙 0.56，单位： $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

菌悬液的浓度优选为 5×10^8 个细胞 / mL，孵育时间优选为 2h，保护剂优选为质量百分含量为 5% 的脱脂奶粉水溶液。

所述真空冷冻干燥条件可采用一般的微生物制品的真空冷冻干燥条件，如干燥温度 -45°C ，真空度 0.54 mPa，干燥时间 24 h。

本发明首先通过正交实验确定影响酵母拮抗菌罗伦隐球酵母真空冷冻干燥效果的主要因子，并在此基础上深入探讨不同生长阶段和保护剂对冷冻干燥制品的生活力的影响，得到罗伦隐球酵母真空冷冻干燥的有效方法。用本发明的方法制备的酵母拮抗菌罗伦隐球酵母真空冷冻干燥制品具有较高的生物活性，活菌率可达 80%。本发明制备工艺简单、成本低廉，具有工业化生产的可行性，将在酵母拮抗菌罗伦隐球酵母及其它微生物的保藏及其相关产品的制备中发挥巨大作用。

附图说明

图 1 为鉴定不同保护剂对酵母拮抗菌罗伦隐球酵母真空冷冻干燥效果的影响的实验结果

图 2 为鉴定不同保护剂对酵母拮抗菌罗伦隐球酵母真空冷冻干燥制品货架期 (0°C ，3 月) 影响的实验结果

图 3 为鉴定不同保护剂对酵母拮抗菌罗伦隐球酵母真空冷冻干燥制品 0°C 贮藏 3 月后细胞膜完整性与活性氧产生影响的实验结果

具体实施方式

下述实施例中如无特别说明均为常规方法。

实施例 1、

一、酵母拮抗菌罗伦隐球酵母菌种的保存、活化及其发酵培养

1、菌种的分离及保存

从苹果果实表面分离获得酵母拮抗菌罗伦隐球酵母菌种，置于甘油中 -20°C 保存（刘海波，田世平，秦国政，徐勇. 罗伦隐球酵母对葡萄采后病害的拮抗效果. 中国农业科学, 2002, 35:831-835）。

2、菌种的活化

从 -20°C 中保存的甘油管中吸取少量菌液，在 NYDA 培养基（葡萄糖 10，大豆蛋白胨 5，牛肉膏 1，酵母提取物 7.5，琼脂 18，单位： $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ）铺板并在 28°C 下培养，72h 后取少量生长良好的酵母拮抗菌接种在 NYDB 培养基（葡萄糖 10，大豆蛋白胨 5，牛肉膏 1，酵母提取物 7.5，单位： $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ）中进一步活化，铺板，并在 NYDA 培养基上分离单菌落。

3、菌种的培养

挑取单菌落接入罗伦隐球酵母的专用培养基（柠檬酸 40，大豆蛋白胨 15，硫酸镁 1.23，氯化钙 0.56，单位： $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ）中（1000mL 三角瓶中含 200mL 培养液），振荡培养（25℃，200rpm）12-18h。

4、发酵培养

以 2% 接种浓度将步骤 3 培养的菌种接种到 120L 发酵罐（含 80L 培养液）中，在相同条件下进行扩大培养。

二、影响酵母拮抗菌罗伦隐球酵母真空冷冻干燥效果的因素分析实验

采用四因素，三水平的正交实验 $L_9(4^3)$ ，确定不同培养时间、悬浮液浓度、保护剂种类以及孵育时间对罗伦隐球酵母真空冷冻干燥效果的影响，找到酵母拮抗菌真空冷冻干燥效果的最主要因素，以便进一步确定对其进行真空冷冻干燥的方式。正交实验 $L_9(4^3)$ 所选用的不同因素与水平的设计如表 1 所示，以酵母拮抗菌 *R. glutinis* 为对照：

表1 影响酵母拮抗菌罗伦隐球酵母与*R. glutinis*真空冷冻干燥效果的正交实验 $L_9(3^4)$ 的因素与水平

因素和水平	培养时间(h)	酵母菌悬液的浓度 (个细胞 / mL)	孵育时间 (h)	保护剂 (5%)
1	24	1×10^8	1	海藻糖
2	48	5×10^8	2	葡萄糖
3	72	5×10^9	3	水

具体实验方法为：用步骤一的方法对罗伦隐球酵母进行培养，每种菌设三个不同的发酵培养时间（24、48 和 72h），培养结束后，离心收集菌体，将菌体用无菌水冲洗 3 次，再按表 1 所示将经不同时间培养的菌体用不同保护剂配成不同

浓度的菌悬液，孵育不同时间后，置于-18℃冰箱中冷冻，24h 后将冷冻样品放入冷冻干燥机（FD-1 型，北京博医康公司）中干燥。干燥温度为-45℃，真空度 0.54 mPa，干燥时间为 24h。干燥结束后立即加入无菌水复水，并进行 1/10，1/100，1/1000，1/10000 梯度稀释，铺板，28℃培养 2d，统计菌落数。实验数据采用一般正交分析的方法进行（Montgomery, D C. Design and analysis of experiments, 4th ed. New York: Wiley, 1996, pp 627-631），实验结果如表 2 所示：

表2 不同培养时间、菌悬液浓度，孵育时间和保护剂对酵母拮抗菌罗伦隐球酵母冷冻干燥效果的正交实验结果及直观分析表

实验组号	培养时间(h)	酵母菌悬液的浓度 (个细胞 / mL)	孵育时间 (h)	保护剂 (5%)	存活率 (%)
1	24	1×10^8	1	海藻糖	0.27
2	24	5×10^8	2	葡萄糖	22.55
3	24	5×10^9	3	水	5.03
4	48	1×10^8	2	水	1.44
5	48	5×10^8	3	海藻糖	0.70
6	48	5×10^9	1	葡萄糖	22.48
7	72	1×10^8	3	葡萄糖	7.11
8	72	5×10^8	1	水	1.55
9	72	5×10^9	2	海藻糖	1.35
K_1^a	18.57	5.88	16.20	1.55	
K_2	16.41	16.53	16.89	34.76	
K_3	6.67	19.24	8.56	5.35	
k_1^b	9.28	2.94	8.10	0.77	
k_2	8.21	8.27	8.45	17.38	
k_3	3.34	9.62	4.28	2.67	
R^c	5.95	6.68	4.17	16.61	

^a $K_i^A = \Sigma$ 存活率 A_i . 实验数据为三个重复实验的平均值

^b $k_i^A = K_i^A/2$. 实验数据为三个重复实验的平均值

^c $R_i^A = \text{最大}(k_i^A) - \text{最小}(k_i^A)$. 实验数据为三个重复实验的平均值

表2数据表明，各因素对罗伦隐球酵母冷冻干燥效果的影响大小依次为：保护剂种类 > 菌悬液浓度 > 酵母菌培养时间 > 保护剂孵育时间，在实验的四个因子中，保护剂种类对罗伦隐球酵母真空冷冻干燥效果的影响最大。

对各因素不同水平之间的均值进行比较，结果表明罗伦隐球酵母的真空冷冻干燥效果在酵母菌培养24-48h内差别不大，酵母菌悬浮液浓度也只有从 1×10^8 个细胞/mL提高到 5×10^8 个细胞/mL时影响较大，保护剂孵育时间在1-2h内对冷冻干燥的影响不大。因此初步确定罗伦隐球酵母的真空冷冻干燥条件为：酵母菌培养时间24-48h，

悬浮液浓度为 5×10^8 – 5×10^9 个细胞 / mL，孵育时间 2h。由于保护剂种类对冷冻干燥效果的影响最大，同时考虑到不同因素之间也可能存在相互作用，在此基础上，在下述实施例中进一步鉴定培养时间和保护剂的种类及浓度对罗伦隐球酵母冷冻干燥效果的影响。

实施例 2、不同保护剂对酵母拮抗菌真空冷冻干燥制品生活力的影响

将用实施例 1 中所用方法分别培养 24 h 和 48 h 的酵母拮抗菌罗伦隐球酵母菌液离心，收集沉淀，无菌水冲洗 3 次。将沉淀分别用不同浓度的保护剂（葡萄糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、柠檬酸钠、醋酸钠、脱脂奶粉和谷氨酸钠）悬浮，以无保护剂的水为阴性对照，以酵母菌经 24h 和 48h 培养后的培养液为对照，使最终菌悬液浓度为 5×10^8 个细胞 / mL，室温孵育 1–2h 后，放入 -18°C 冰箱中冷冻 24 h，然后将冷冻样品放入 FD-1 型冷冻干燥机中干燥，干燥温度 -45°C ，真空度 0.54 mPa，时间 24 h。

干燥结束后将样品取出，一部分立即用无菌水复水至冷冻干燥前的体积，采用稀释平板法计数，考察不同保护剂对酵母菌冷冻干燥后存活率的影响。另一部分冷冻干燥样品用离心管包装、密封， 0°C 下贮藏 3 个月后，再用无菌水复水，稀释平板法计数，以鉴定不同冷冻干燥条件对酵母拮抗菌冷冻干燥制品货架期的影响。

对不同保护剂筛选单因素实验的部分数据利用 SPSS 软件分析，通过 ANOVA 方式，采用邓肯式多重差异分析 (Duncan's multiple range tests) 方法对处理之间的差异性在 $P < 0.05$ 水平上进行分析。实验结果如图 1 所示，表明冷冻干燥后，仅以无菌水悬浮的罗伦隐球酵母存活率在 3.9–5.1% 之间，其中酵母菌培养 24h 后的存活率较高。而以培养液悬浮细胞时，无论培养 24h 还是 48h，罗伦隐球酵母冷冻干燥后的活菌率均在 0.5% 以下。

酵母拮抗菌罗伦隐球酵母冷冻干燥后的存活率也因保护剂的种类和浓度不同而有明显差异。在四种糖中，只有葡萄糖和蔗糖对罗伦隐球酵母的保护作用比较明显，两者均为当保护剂浓度为 10%、培养时间 24h 时的效果最好，即便如此，拮抗菌罗伦隐球酵母冻干后的存活率也只有 46.8% 和 31.8%。而以乳糖和海藻糖处理的酵母菌存活率均低于 15%。在三种钠盐中，柠檬酸钠的作用效果较差；5% 醋酸钠和谷氨酸钠、培养 48h 时的效果较好，活菌率分别达到 33.9% 和 28.2%。脱脂奶粉对酵母拮抗菌罗伦隐球酵母同样具有较好的保护作用，在 5% 脱脂奶粉的保护下，培养 48h 时酵母菌冻干后的存活率达到 80%。

酵母菌罗伦隐球酵母的不同生长阶段受到保护剂的浓度效应影响很大。培养 24h 时，增加葡萄糖和蔗糖浓度均能显著提高罗伦隐球酵母的存活率，而海藻糖浓度从 5% 提高到 10% 时罗伦隐球酵母的活菌数反而显著降低。酵母菌培养 48h 后，除葡萄糖

外，增加保护剂浓度均显著降低罗伦隐球酵母的冷冻干燥效果。

同样，酵母拮抗菌罗伦隐球酵母的不同生长阶段对其冷冻干燥效果的影响也因保护剂的种类和浓度不同而有明显差异。以谷氨酸钠和脱脂奶粉为保护剂时，延长培养时间均能显著提高罗伦隐球酵母的存活率，而且不同浓度的保护剂均是如此。而以葡萄糖和海藻糖为保护剂时，酵母拮抗菌罗伦隐球酵母的存活率均随着培养时间延长而显著降低。

实施例 3、不同保护剂对罗伦隐球酵母的冷冻干燥制品耐贮性的影响

实施例 2 获得的罗伦隐球酵母冷冻干制品在 0℃下贮藏 3 个月后，各处理的拮抗菌罗伦隐球酵母冷冻干燥样品的存活率都大幅度下降（图 2）。在罗伦隐球酵母培养时间为 24 h 时，3 个月后所有处理的冻干制品存活率都降至 3% 以下。酵母菌培养 48 h 时，除了乳糖、海藻糖和乙酸钠三种保护剂的不同浓度冻干制品活菌率均低于 1% 外，其它保护剂在浓度为 5% 时，存活率为 8-19 % 之间，而保护剂浓度为 10 % 时，存活率则降至 0.8-6.7% 之间。

实施例 4、不同保护剂对酵母拮抗菌罗伦隐球酵母冷冻干制品细胞膜完整性与活性氧的影响

用活细胞荧光标记法测定实施例 2 获得的罗伦隐球酵母冷冻干制品的细胞膜完整性与活性氧产生。结果如图 3 所示 Bright Field（明场）为所有细胞总数，PI 标记的细胞为红色（膜系统破坏），H₂DCFDA 标记的细胞呈绿色（产生 ROS），双染料（Integrated，用 PI，H₂DCFDA 共同标记）标记的细胞为黄色（正在死亡）。A：脱脂奶粉（5%），48h；B：脱脂奶粉（10%），48h；C：脱脂奶粉（5%），24h；D：无菌水。Bar，20 μ m。），表明在 0℃下贮藏 3 个月后，对培养 48 h 的罗伦隐球酵母而言，以 5% 脱脂奶粉为保护剂的冻干样品中大多数酵母菌的细胞膜保持完整，提高脱脂奶粉浓度（10%）则能促进酵母菌细胞膜的破坏，但两种处理中均有部分细胞能够产生 ROS（图 3A，B）。缩短酵母菌培养时间（24 h）同样能提高罗伦隐球酵母中 PI(+) 的细胞比例，冻干制品于 0℃贮藏 3 个月后几乎所有细胞均被 PI 染色，而无法检测到产生 ROS 的细胞（图 3C），这与不加保护剂的处理相差不大（图 3D）。不同处理之间的这些差异与利用平板稀释法得到的结果基本一致。

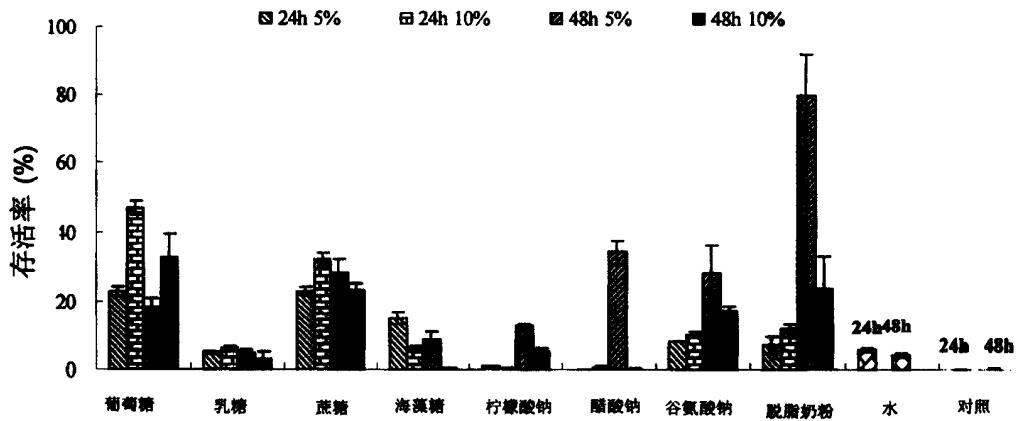


图 1

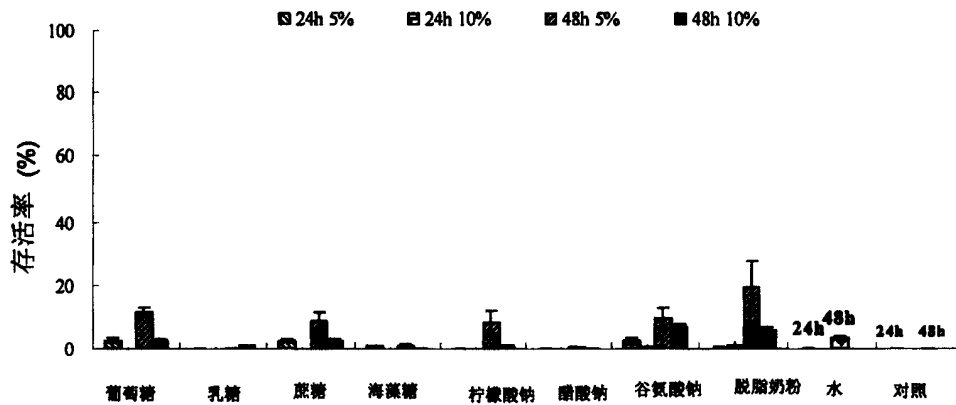


图 2

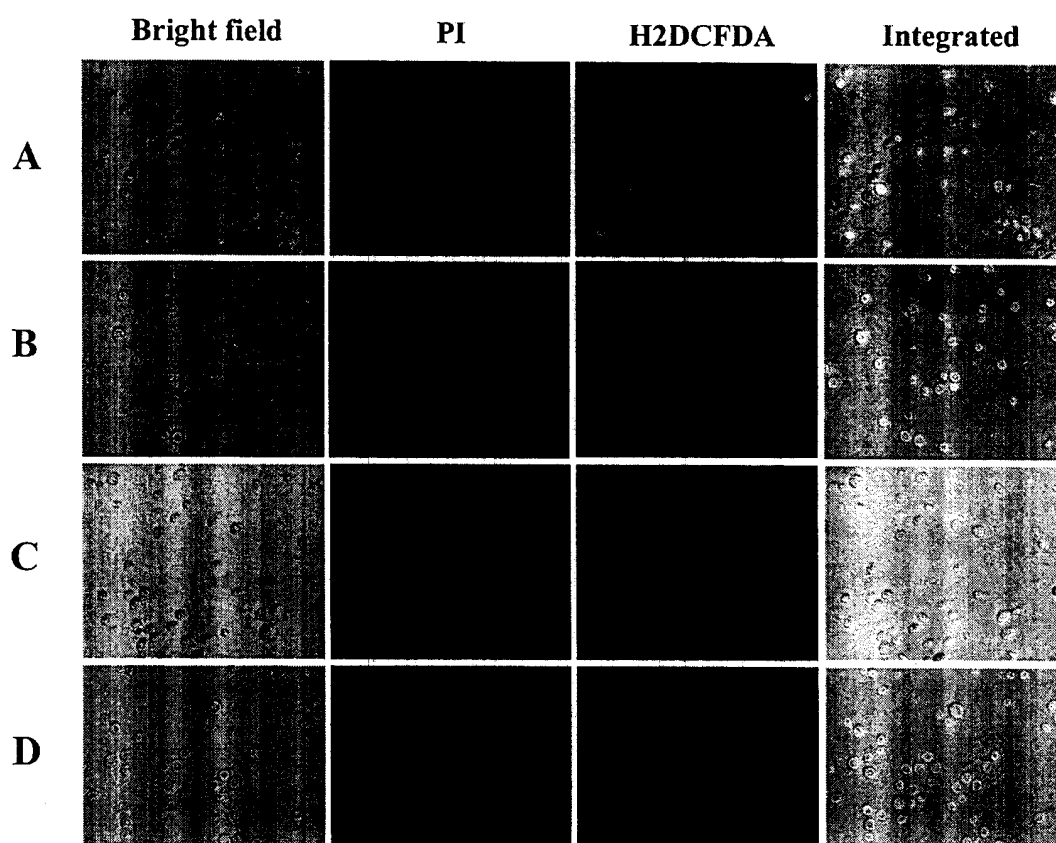


图 3